

Attorney Docket No. 04853.0079  
Customer Number 22,852

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: )  
Kazunari TAIRA et al. ) Group Art Unit: 1645  
Serial No.: 09/974,974 ) Examiner: Not Yet Assigned  
Filed: October 12, 2001 )  
For: NUCLEIC ACID ENZYMES )  
ACQUIRING AN ACTIVITY FOR )  
CLEAVING A TARGET RNA BY )  
RECOGNIZING ANOTHER )  
MOLECULE )

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

Sir:

CLAIM FOR PRIORITY

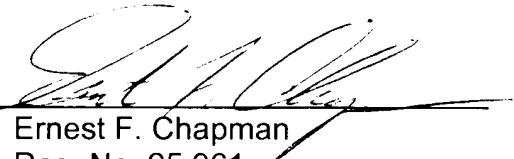
Under the provisions of 35 U.S.C. § 119, Applicants hereby claim the benefit of the filing date of Japanese Patent Application No. 2000-313320, filed October 13, 2000, for the above-identified U.S. patent application.

In support of this claim for priority, enclosed is one certified copy of the priority application.

Respectfully submitted,

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,  
GARRETT & DUNNER, L.L.P.

By:

  
Ernest F. Chapman  
Reg. No. 25,961

Dated: March 14, 2002

FINNEGAN  
HENDERSON  
FARABOW  
GARRETT &  
DUNNER LLP

1300 I Street, NW

Washington, DC 20005

202.408.4000

Fax 202.408.4400

[www.finnegan.com](http://www.finnegan.com)

EFC/FPD/sci  
Enclosures

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日  
Date of Application: 2000年10月13日

出願番号  
Application Number: 特願2000-313320

[ST.10/C]: [JP2000-313320]

出願人  
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所

2002年 3月 5日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造

出証番号 出証特2002-3013350

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 117F0118  
 【提出日】 平成12年10月13日  
 【あて先】 特許庁長官 殿  
 【国際特許分類】 C12N 15/55  
                   C12N 9/22  
                   C12Q 1/34  
                   A61K 48/00  
                   A61K 38/43  
 【発明の名称】 R N A分子を認識することにより他の特定の標的R N A  
                   に対する切断活性を獲得する核酸酵素  
 【請求項の数】 30  
 【発明者】  
   【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番4 工業技術院 産業技術  
                   融合領域研究所内  
   【氏名】 多比良 和誠  
 【発明者】  
   【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番4 工業技術院 産業技術  
                   融合領域研究所内  
   【氏名】 薩科 雅岐  
 【発明者】  
   【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番4 工業技術院 産業技術  
                   融合領域研究所内  
   【氏名】 薩科 知子  
 【特許出願人】  
   【識別番号】 000001144  
   【氏名又は名称】 工業技術院長 梶村 眞二  
 【指定代理人】  
   【識別番号】 220000415

【氏名又は名称】 工業技術院 産業技術融合領域研究所長 岸 輝雄

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 RNA分子を認識することにより他の特定の標的RNAに対する切断活性を獲得する核酸酵素

【特許請求の範囲】

【請求項1】 センサー部位と切断活性部位を有する核酸酵素であって、切断活性部位が標的RNAと結合し、センサー部位が標的RNAと異なる別のRNAと結合した時のみ標的RNAに対し切断活性を示す、前記核酸酵素。

【請求項2】 下記のヌクレオチド配列(10)を含むRNA分子および下記のヌクレオチド配列(20)を含むRNA分子が形成する二量体の構造を有する請求項1記載の核酸酵素。

$5' X_1^1 \cdots X_h^1 Y_1^1 \cdots Y_i^1 Z_1^1 \cdots Z_j^1 3'$  (10)

$5' Z_1^2 \cdots Z_n^2 Y_1^2 \cdots Y_m^2 X_1^2 \cdots X_k^2 3'$  (20)

(配列中、 $X_1^1 \sim X_h^1$ 、 $X_1^2 \sim X_k^2$ 、 $Y_1^1 \sim Y_i^1$ 、 $Y_1^2 \sim Y_m^2$ 、 $Z_1^1 \sim Z_j^1$  および  $Z_1^2 \sim Z_n^2$  は、各々独立に、A、U、T、CまたはGのいずれかであり、

$h$ および $k$ は1以上の整数であり、

$i$ および $m$ は1以上の整数であり、

$j$ は1以上の整数であり、

$n$ は1以上の整数であり、

$X_1^1 \cdots X_h^1$ および $X_1^2 \cdots X_k^2$ は、センサー部位を構成するヌクレオチド配列であり、 $Y_1^1 \cdots Y_i^1$ および $Y_1^2 \cdots Y_m^2$ は、ステムを形成し、センサー部位にRNAが結合したときのみ安定に $Mg^{2+}$ イオンを捕捉する空洞を形成しうる領域を含むヌクレオチド配列であり、 $Z_1^1 \cdots Z_j^1$ および $Z_1^2 \cdots Z_n^2$ は、標的RNAの切断部位周辺の配列に相補的である領域を含むヌクレオチド配列である。)

【請求項3】 標的RNAが細胞の生命維持に不可欠な蛋白質をコードするmRNAである請求項1または2記載の核酸酵素。

【請求項4】 標的RNAがbcl-2などのアポトーシスを阻止する蛋白質をコードするmRNAである請求項3記載の核酸酵素。

【請求項5】 標的RNAがウイルスRNAあるいは癌等の疾患に関連する蛋白質をコードするmRNAである請求項1または2記載の核酸酵素。

【請求項6】 センサー部位が結合するRNA分子が、疾患関連蛋白質をコードするmRNAである請求項1または2記載の核酸酵素。

【請求項7】 センサー部位が結合するRNA分子が、組織特異的または時限特異的に発現するmRNA、あるいは核酸酵素の活性調節を目的として人為的に導入したRNAである請求項1または2記載の核酸分子。

【請求項8】 疾患関連蛋白質が、癌細胞マーカー由来のmRNA、あるいはHIV由来のtat mRNAなどのウイルス由来のRNAである請求項5または6記載の核酸酵素。

【請求項9】 下記のヌクレオチド配列(1)を含むRNA分子および下記のヌクレオチド配列(2)を含むRNA分子が形成する二量体の構造を有する請求項1または2記載の核酸酵素。

5' GGUCCUGGCC UGAUGAGAGU GAUGAGCUCU UC 3' (1) (配列番号1)

5' GUCUGACUGU UCAUCGAAAC CGGGUCC 3' (2) (配列番号2)

(ただし、ヌクレオチド配列(1)の1番目から9番目のヌクレオチドおよびヌクレオチド配列(2)の19番目から27番目のヌクレオチドは標的RNAの切断部位周辺の配列に相補的になるように改変されてもよい。また、ヌクレオチド配列(1)の20番目から32番目のヌクレオチドおよびヌクレオチド配列(2)の1番目から12番目のヌクレオチドはエイズの原因ウイルスであるHIV-1に特異的な他のmRNA中の配列、あるいはHIV-1のtat mRNA中の他の部位の配列に相補的になるよう改変されてもよい。)

【請求項10】 疾患関連蛋白質が、慢性骨髓性白血病由来のBCR-ABL mRNAである請求項5または6記載の核酸酵素。

【請求項11】 下記のヌクレオチド配列(3)を含むRNA分子および下記のヌクレオチド配列(4)を含むRNA分子が形成する二量体の構造を有する請求項1あるいは2記載の核酸酵素。

5' GGUCCUGGCC UGAUGAGAGU UAUUGAUGGU CAG 3' (3) (配列番号3)

5' GAAGGGCUUC UUUCAUCGAA ACCGGGUCC 3' (4) (配列番号4)

(ただし、ヌクレオチド配列(3)の1番目から9番目のヌクレオチドおよびヌクレオチド配列(4)の20番目から29番目のヌクレオチドは標的RNAの切断部位周

辺の配列に相補的になるように改変されてもよい。また、ヌクレオチド配列(3)の20番目から33番目のヌクレオチドおよびヌクレオチド配列(4)の1番目から14番目のヌクレオチドは慢性骨髓性白血病に特異的な他のmRNA中の配列、あるいはBCR-ABL mRNA中の他の部位の配列に相補的になるように改変されてもよい。)

【請求項12】 核酸酵素配列の上流にリンカー配列、tRNA<sup>Val</sup>プロモーター配列またはその両方が付加されている請求項1～11のいずれかに記載の核酸酵素。

【請求項13】 核酸酵素配列の上流にpol II系プロモーター配列またはpol III系プロモーター配列)が付加されている請求項1～11のいずれかに記載の核酸酵素。

【請求項14】 リンカー配列は下記のヌクレオチド配列(5)またはヌクレオチド配列(6)を含む請求項12記載の核酸酵素。

5' AAA 3' (5)

5' UUU 3' (6)

【請求項15】 tRNA<sup>Val</sup>プロモーター配列が下記のヌクレオチド配列(5)を含む請求項12記載の核酸酵素。

5' ACCGUUGGUU UCCGUAGUGU AGUGGUUAUC ACGUUCGCCU AACACGCGAA AGGUCCCCGG U  
UCGAAACCG GGCACUACAA AAACCAAC 3' (7) (配列番号5)

【請求項16】 核酸酵素配列にデリバリー剤が結合されている請求項1～11のいずれかに記載の核酸酵素。

【請求項17】 デリバリー剤がペプチド、ペプチド疑似物、ウイルス由来タンパク、コレステロール、ステロイド、コレステロール誘導体、脂肪、ビタミン、ビオチン、葉酸、レチノ酸、タンパク、フェリチン、LDL、インスリン、抗体、糖もしくはオリゴ糖、ポリエチレンジリコール、またはアミノ酸のホモポリマー若しくはコポリマーである請求項16記載の核酸酵素。

【請求項18】 核酸酵素配列の下流に付加配列、ターミネーター配列またはその両方が付加されている請求項1～17のいずれかに記載の核酸酵素。

【請求項19】 付加配列は下記のヌクレオチド配列(8)～(10)のいずれ

かを含む請求項1～8記載の核酸酵素。

5' AAA 3' (8)

5' AACCGUA 3' (9)

5' UUUUU 3' (10)

【請求項20】 請求項1～19のいずれかに記載の核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクター。

【請求項21】 請求項1～19のいずれかに記載の核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクターDNAを鑄型として、RNAに転写することを特徴とする、該核酸酵素の製造方法。

【請求項22】 請求項1～19のいずれかに記載の核酸酵素を含む遺伝子導入ベヒクル。

【請求項23】 正電荷リポソームである、請求項22記載のベヒクル。

【請求項24】 請求項1～19のいずれかに記載の核酸酵素、請求項20記載の発現ベクター、または請求項22もしくは23記載のベヒクル、を有効成分として含む医薬組成物。

【請求項25】 標的RNAが原因となって生じる疾病を予防および／または治療するための請求項24記載の医薬組成物。

【請求項26】 請求項1～19のいずれかに記載の核酸酵素を生体内で発現させて、疾病の原因となる異常型mRNAの発現を抑制または阻害するための請求項24記載の医薬組成物。

【請求項27】 請求項1～19のいずれかに記載の核酸酵素を用いて、標的RNAを特異的に切断する方法。

【請求項28】 標的RNAが疾病の原因となる異常型mRNAである請求項27記載の方法。

【請求項29】 請求項1～19のいずれかに記載の核酸酵素を含む宿主細胞であって、大腸菌などの原核細胞、ヒト細胞、哺乳類細胞、植物細胞、酵母細胞など真核細胞から選択される宿主細胞。

【請求項30】 請求項1～19のいずれかに記載の核酸酵素を含有する診断薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明が属する技術分野】

本発明は、核酸酵素およびその利用に関し、より詳細には、共存する他のRNA分子配列に相補結合することにより標的RNAに対するRNA切断活性を獲得する核酸酵素、たとえば感染細胞、癌化細胞などの有害細胞を選択的かつ効率的に死滅させるRNA切断活性をもつ核酸酵素あるいは細胞特異的、時限特異的または人為的に導入したRNAによってRNA切断活性が調節可能な核酸酵素、およびその利用に関する。

## 【0002】

## 【従来技術】

1980年初頭、米国コロラド大学のCechらによるテトラヒメナのrRNAのセルフスプライシング現象の発見 (K.Kruger, P.J.Grabowski, A.J.Zaug, J.Sands, D.E.Gottschling, T.R.Cech, *Cell*, 31, 147-157(1982)) と、米国エル大学のAltmanが行ったRNAとタンパク質の複合体酵素であるリボヌクレアーゼPの解析結果 (C.Guerrier-Takada, K.Gaydiner, T.Marsh, N.Pace, S.Altman, *Cell*, 35, 849-857(1983) ) から、触媒機能を有するRNAであるリボザイム(ribozyme:ribonucleotide acid+enzyme)が見いだされた。以降、様々なリボザイムが発見され (R.H.Symons, *Trend. Biochem. Sci.*, 14, 445-450(1989) ; R.H.Symons, *Annu. Rev. Biochem.*, 61, 641-671(1992) ; J.Bratton, P.Chartrand, G.Ferbeyre, R.Cedergren, *Biochim. Biophys. Acta*, 1216, 345-359(1993) ; Hasehoff, J and W.L.Gerlach, *Nature*, 334, 585-591(1988) ; C.J.Hutchins, P.D.Rathjen, A.C.Forster, R.H.Symons, *Nucleic Acids. Res.*, 14, 3627-3640(1986) )、逆転写酵素、イントロンの発見、RNA editingなどとあわせて、不動のセントラルドグマの概念をゆるがしたのである。同時に、それまでDNAとタンパク質の間で情報の仲介屋程度にしか認識されていなかったRNAが、(遺伝)情報と(触媒)機能の二役を兼ね備えていることから、RNA分子こそが生命の起源とする“RNAワールド”説の中心的分子として注目されるようになった (G.F.Joyce, *Nature*, 338, 217-224(1989) ; N.R.Pace, T.L.Marsh, *Origins of*

Life, 16, 97(1985) ; A.Lazcano, R.Guerrero, J.Oro, J.Mol. Evol., 27, 283(1988) ; L.E.Orgel, Nature, 358, 203(1992) ; R.F.Gesteland, J.F.Atkins, The RNA World, Monograph 24, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York(1993)。

## 【0003】

なかでもハンマーヘッド型リボザイム（図1A、左）は、これまで最も良く研究がなされてきたリボザイムの一つである。これは、天然においては自己切断反応（シス型）として機能するリボザイムであるが（T.R.Cech, Annu. Rev. Biochem., 59, 543(1990) ; A.C.Foster, R.H.Symons, Cell, 49, 211(1987) ; A.C.Jeffries, R.H.Symons, Nucleic Acids Res., 17, 1371(1989)）、UhlenbeckらとHaseloffとGerlachらのグループによって2本のRNA鎖（基質領域と酵素活性保持領域）に分割（トランス化）されたことから（O.C.Uhlenbeck, Nature, 328, 596(1987) ; J.Hasehoff, W.L.Gerlach, Nature, 334, 585(1988)）、リボザイムによる遺伝子治療への応用の可能性が示唆された。以降、癌やエイズなどを標的とした様々な応用研究が、数多く報告されている（M.Cotten, M.L.Bimstiel, EMBO J8, 861(1989) ; N.Sarver, E.Cantin, O.Chang, O.Lande, D.Stephens, J.Zaia, J.Rossi, Science 247, 1222(1990) ; M.Homann, M.Tzortzakari, K.Rittner, S.Sczakiel, M.Tabler, Nucleic Acids Res 21, 2809(1993) ; R.C.Mulligan, Science 260, 926(1993) ; S.Altman : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 10898(1993) ; P.Marschall, J.B.Thompson, F.Eckstein, Cell. Mol. Neurobiol., 14, 523(1994) ; S.M.Sullivan, J.Invest. Dermatol., 103, 85(1994) ; F.H.Cameron, P.A.Jennings, Antisense Res. Dev., 4, 87(1994) ; L.Q.Sun, D.Warriow, L.Wang, C.Witherington, J.Macpherson, G.Symonds, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9715(1994) ; R.E.Christoffersen, J.J.Marr, J.Med. Chem. 38, 2023(1995) ; G.Ferbeyre, J.Bratty, H.Chen, R.Cederberg, Gene 155, 45(1995) ; M.Kiehnkopf, E.L.Equivel, M.A.Brach, F.Herrmann, J.Mol. Med., 73, 65(1995) ; J.D.Thompson, D.Macejak, L.Couture, D.T.Stinchcomb, Nat. Med. 1, 277 (1995) ; T.Tuschl, J.B.Thomson, F.Eckstein, Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 296 (1995)）。

## 【0004】

リボザイムは、基質と相補的な塩基対を形成することによって、基質RNAと結合する。その後、反応に必須となるマグネシウム存在下で、基質RNA分子の切断が起こる。基質の認識は、*Stem I* と*Stem III* の双方の基質結合領域がそれに対応した基質配列と適切な塩基対を形成することによってなされるので、リボザイムの基質特異性は非常に高い。基質特異性が非常に高いと、細胞内に於いてほとんど副作用が起こらないため、リボザイムを遺伝子発現阻害剤として用いる場合の大きなメリットとなる。

## 【0005】

しかし、このリボザイムの高い基質特異性にも例外がある。それは、ターゲットとなる基質がキメラ（二つ以上の異なる遺伝子配列が結合して一つの遺伝子として機能する）の場合である。本来、ある配列（exon 2）に別の配列（exon 3）がつながるべきところへ、スプライシングのミスなどが起きて別のキメラ配列（exon 1-exon 3）が誤って生じ、癌などの発病を招く場合、リボザイムを用いてこの異常なRNAの発現を抑制するという遺伝子治療が考えられる。それぞれの配列自体（exon 1, exon 2, exon 3）は正常なメッセージであるので、異常型のジャンクション配列（exon 1-exon 3）をもつmRNAのみを特異的に切斷し、その発現を抑えることが重要となってくる。つまり、正常なmRNA（exon 2-exon 3）には全く影響を及ぼさないリボザイムを用いなくてはならない（例：BCR-ABL mRNA、図2）。

## 【0006】

従来のハンマーヘッド型リボザイムを用いてこのような遺伝子の発現抑制を行おうとする場合、異常型のmRNAに特異的な配列部分であるexon 1-exon 3のジャンクション部位に、リボザイムの切斷可能な配列のGUCトリプレット（一般にはNUX（N ; A, G, C, U X ; A, C, U））がある場合には、問題は生じない。しかし、運良くジャンクション部位またはその近傍に、リボザイムの切斷配列があることはまれである。ジャンクション部位に切斷可能な配列がない場合、ジャンクション部位から遠く離れた部位にある切斷配列をターゲットとするしかない。しかしジャンクションから遠く離れた切斷部位自体の配列は、正常な

mRNAにも異常型のmRNAにも存在している。結局、正常型のmRNAへの非特異的な切断が起こってしまうことがどうしても避けられなくなる（例：ABL mRNAへの切断、図2）。また、たとえジャンクション部位またはその近傍にリボザイムの切断配列であるNUX配列があったとしても、それがハンマーヘッド型リボザイムが好んで効率的に切断できる配列のトリプレット（GUCトリプレット）である可能性はさらに低い。従って、このようなケースに於いても、高い切断活性を保ったまま、特異性の非常に高いリボザイムを構築することは困難であった。

## 【0007】

実際このようなある特定のキメラ型mRNAが発病の原因になる有名な例として、CML（慢性骨髓性白血病）やALL（急性リンパ性白血病）の原因となるフィラデルフィア染色体の形成がある。これらの白血病では染色体相互転座t(9;22)(q34;q11)が生じてBCR-ABL融合遺伝子が生成する。CMLではK28 translocationとL6 translocationの2つのタイプの染色体相互転座により、2つのタイプのBCR-ABL融合遺伝子が生じ、最終的に2種類のキメラmRNAがスプライシングの結果生成する(K28ジャンクション(b3a2)mRNAとL6ジャンクション(b2a2)mRNA)（図2）。そのうちのひとつにはBCR-ABLジャンクション部位の近くにハンマーヘッド型リボザイムが切断できる配列(GUUトリプレット)があるが(K28ジャンクション(b3a2)mRNA)、もう一つのタイプのmRNAにはジャンクション部位の近傍に、有力な切断配列が存在しない(L6 ジャンクション(b2a2)mRNA)。そのため、従来のハンマーヘッド型リボザイムでは後者のmRNAからの発現を特異的に阻害することができない。現在までに報告されているL6 mRNAからの異常なタンパク質(p<sub>210</sub><sup>BCR-ABL</sup>)の発現をリボザイムで阻害する試みは、ハンマーヘッド型リボザイムに長いアンチセンス部分を足し、それをジャンクション部位に相補的に結合させて、切断特異性を獲得しようとしたものがほとんどである。しかし、この長いアンチセンス部分の付加によってリボザイムの基質結合部分が長くなると、いったんリボザイムが基質に結合した後、基質から解離するステップが非常に遅くなる。そのため、酵素としてのターンオーバーができず切断効率が低下してしまう。さらに今までして獲得しようとした基質特異性は期待したほど高くない。これは長すぎるアンチセンス部分の配列が、正常型mRNAであるABL mRNA

やBCR mRNAへ部分的に結合してしまい、リボザイムの基質認識力を甘くさせてしまうからである。その結果正常型mRNAへの非特異的切断が避けられないといった状況になっている（図2）。

## 【0008】

この解決策として、本発明者らは、先に、基質に対してアロステリックな切断活性を示す核酸酵素を構築した（W099/46388）。すなわち、1つの活性中心領域と2つの基質結合領域を持ち、一方の基質結合領域でL6(b2a2)キメラ型mRNAのジヤンクション部位に結合し、もう一方の基質結合領域でジヤンクション部位から遠く離れた効率の良い切断配列に結合して、その切断配列の後で基質を切断することができる核酸酵素（リボザイム）を構築した。このような核酸酵素は、標的RNAが疾患の原因となるキメラ型mRNAなどで有用である。

## 【0009】

しかしながら、上記の技術は、特定配列認識と酵素活性が同一RNA分子内で生じることに限定され、分子間での認識、そして、酵素活性の発現が可能かどうか定かでないという問題点を有している。

## 【0010】

## 【発明が解決しようとする課題】

このような状況下、本発明者らは、2種類のRNA分子の一方を認識することより、他方のRNA分子の切断が可能になれば、HIV感染やがん治療等において、感染細胞や癌化細胞のみを選択的に殺すことも可能になるのではないかとの発想のもと、研究を進めた。

## 【0011】

すなわち、本発明は、共存するRNA分子を認識することにより他の特定のRNAに対する切断活性を獲得する核酸酵素を提供することを目的とする。このような酵素を、本明細書ではトランス・マキシザイムともいう。

また、本発明は、前記核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクター、あるいは前記核酸酵素を含む遺伝子導入ベヒクル、を提供することも目的とする。

## 【0012】

さらに、本発明は、前記核酸酵素または前記発現ベクターまたは前記遺伝子導

入ベヒクルを有効成分として含む医薬組成物を提供することも目的とする。

さらにまた、本発明は、前記の核酸酵素の製造方法および利用方法を提供することも目的とする。

#### 【0013】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意検討を行なった結果、以下に記載する発明を完成するに至った。

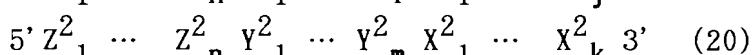
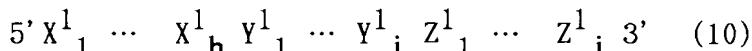
すなわち、本発明は、その一の態様において、共存するRNA分子を認識することにより他の特定のRNAに対する切断活性を獲得する核酸酵素を提供する。具体的には、本発明は、センサー部位と切断活性部位を有する核酸酵素であって、切断活性部位が標的RNAと結合し、センサー部位が標的RNAと異なる別のRNAと結合した時のみ標的RNAに対し切断活性を示す、前記核酸酵素を提供する。ここでセンサー部位とは、標的RNAと異なる別のRNAの核酸配列に相補的な配列を含むために該RNAの核酸配列に結合性を有する部位をいう。

#### 【0014】

本発明の核酸酵素は、モノメリックでもよいし、あるいは（亦モもしくはヘテロ）ダイメリックでもよいが、好ましくはヘテロダイメリックである。本発明の核酸酵素は、センサー部位と切断活性部位が2つの異なるRNAの各々と正しく結合したときに該酵素がMg<sup>2+</sup>イオンを捕捉する空洞を分子内または分子間で形成するようにコンホメーション変化することによって、標的RNAの特異的切断を可能にする。このため、本発明の酵素のセンサー部位と切断活性部位の核酸配列は、これらに結合するRNA配列と完全にもしくは実質的に相補的な関係にあるのがよい。「実質的に」とは、該酵素の配列と該酵素に結合するRNA配列が互いに、マグネシウムイオンを捕捉する空洞を形成しうる程度の相補性を有していることを意味する。

#### 【0015】

本発明の核酸酵素は、下記のヌクレオチド配列(10)を含むRNA分子および下記のヌクレオチド配列(20)を含むRNA分子が形成する二量体の構造を有するとよい。



(配列中、 $X_1^1 \sim X_h^1$ 、 $X_1^2 \sim X_k^2$ 、 $Y_1^1 \sim Y_i^1$ 、 $Y_1^2 \sim Y_m^2$ 、 $Z_1^1 \sim Z_j^1$  および  $Z_1^2 \sim Z_n^2$  は、各々独立に、A、U、T、CまたはGのいずれかであり、

$h$ および $k$ は1以上の整数(例えば、1～100の整数)であり、

$i$ および $m$ は1以上の整数(例えば、1～100の整数)であり、

$j$ は1以上の整数(例えば、1～100の整数)であり、

$n$ は1以上の整数(例えば、1～100の整数)であり、

$X_1^1 \cdots X_h^1$ および $X_1^2 \cdots X_k^2$ は、センサー部位を構成するヌクレオチド配列であり、 $Y_1^1 \cdots Y_i^1$ および $Y_1^2 \cdots Y_m^2$ は、ステムを形成し、センサー部位にRNAが結合したときのみ安定にMg<sup>2+</sup>イオンを捕捉する空洞を形成しうる領域を含むヌクレオチド配列であり、 $Z_1^1 \cdots Z_j^1$ および $Z_1^2 \cdots Z_n^2$ は、標的RNAの切断部位周辺の配列に相補的である領域を含むヌクレオチド配列である。)

#### 【0016】

標的RNAの例としては、細胞の生命維持に不可欠な(言い換えれば、細胞が生存するのに必要な)蛋白質をコードするmRNA、あるいはウイルスRNAまたは癌等の疾患に関連する蛋白質をコードするmRNAが挙げられる。たとえば、アポトーシス阻止因子であるBcl-2ファミリー(*bcl-2*, *mcl-1*, *bfl-1*, *bax-α*, *bak*, *bik*, *bcl-X<sub>L</sub>*, *bcl-X<sub>S</sub>*)が挙げられる(*bcl-2* mRNAを切断する野生型のハンマーヘッド型リボザイムを図3Aに示す)。一方、標的RNAと共に存し、トランス・マキシザイムのセンサー配列に認識されるRNAとしては、疾病の原因となるmRNAが適当である。たとえば、エイズの原因ウイルスであるHIV-1のtat mRNAが挙げられる。このトランス・マキシザイムの構築例を図3Bに示す。この場合の核酸酵素は、例えば、下記のヌクレオチド配列(1)を含むRNA分子および下記のヌクレオチド配列(2)を含むRNA分子が形成する二量体の構造を有するとよい(図3B参照)。

#### 【0017】



(ただし、ヌクレオチド配列(1)の1番目から9番目のヌクレオチドおよびヌク

レオチド配列(2)の19番目から27番目のヌクレオチドは標的RNAの切断部位周辺の配列に相補的になるように改変されてもよい。また、ヌクレオチド配列(1)の20番目から32番目のヌクレオチドおよびヌクレオチド配列(2)の1番目から12番目のヌクレオチドはエイズの原因ウイルスであるHIV-1に特異的な他のmRNA中の配列、あるいはHIV-1のtat mRNA中の他の部位の配列に相補的になるように改変されてもよい。)

## 【0018】

さらに、別の疾病として慢性骨髓性白血病を狙ったトランス・マキシザイムを構築例を図3Cに示す。センサー配列に認識されるRNAとしては、疾患関連蛋白質をコードするmRNA、組織特異的または時限特異的に発現するmRNA、あるいは核酸酵素の活性調節を目的として人为的に導入したRNAである。たとえば疾病の原因となるBCR-ABL mRNAが例示される。この場合の核酸酵素は、例えば、下記のヌクレオチド配列(3)を含むRNA分子および下記のヌクレオチド配列(4)を含むRNA分子が形成する二量体の構造を有するとよい(図3C参照)。

## 【0019】

5' GGUCCUGGCC UGAUGAGAGU UAUUGAUGGU CAG 3' (3) (配列番号3)

5' GAAGGGCUUC UUUCAUCGAA ACCGGGUCC 3' (4) (配列番号4)

(ただし、ヌクレオチド配列(3)の1番目から9番目のヌクレオチドおよびヌクレオチド配列(4)の20番目から29番目のヌクレオチドは標的RNAの切断部位周辺の配列に相補的になるように改変されてもよい。また、ヌクレオチド配列(3)の20番目から33番目のヌクレオチドおよびヌクレオチド配列(4)の1番目から14番目のヌクレオチドは慢性骨髓性白血病に特異的な他のmRNA中の配列、あるいはBCR-ABL mRNA中の他の部位の配列に相補的になるように改変されてもよい。)

## 【0020】

核酸酵素配列(たとえば上記ヌクレオチド配列(1)~(4))の上流にリンカー配列、プロモーター配列(たとえばtRNA<sup>Val</sup>プロモーター配列、pol II系もしくはpol III系プロモーター配列(tRNA, snRNAなど)等)またはその両方が付加されていてもよい。核酸酵素配列の上流に付加されているリンカー配列は下記のヌク

レオチド配列(5)またはヌクレオチド配列(6)を含むとよい。

5' AAA 3' (5)

5' UUU 3' (6)

#### 【0021】

また、tRNA<sup>Val</sup>プロモーター配列は下記のヌクレオチド配列(7)を含むとよい(図7A参照)。

5' ACCGUUGGUU UCCGUAGUGU AGUGGUUAUC ACGUUCGCCU AACACGCGAA AGGUCCCCGG U  
UCGAAACCG GGCACUACAA AAACCAAC 3' (7) (配列番号5)

さらに、核酸酵素配列(たとえば上記ヌクレオチド配列(1)～(4))の下流に付加配列、ターミネーター配列またはその両方が付加されていてもよい。付加配列は下記のヌクレオチド配列(8)～(10)のいずれかを含むとよい。

5' AAA 3' (8)

5' AACCGUA 3' (9)

5' UUUUU 3' (10)

#### 【0022】

本発明はさらに、核酸酵素配列にデリバリー剤が結合されている核酸酵素を提供する。デリバリー剤は、たとえばペプチド、ペプチド疑似物、ウイルス由来タンパク、コレステロール、ステロイド、コレステロール誘導体、脂肪、ビタミン、ビオチン、葉酸、レチン酸、タンパク、フェリチン、LDL、インスリン、抗体、糖もしくはオリゴ糖、ポリエチレングリコール、またはアミノ酸のホモポリマー若しくはコポリマーから選択される。

#### 【0023】

また、本発明は、前記の核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクターを提供する。ベクターは、核酸酵素合成用ベクターおよび遺伝子導入(遺伝子治療)用ベクターの両方を含む。

さらに、本発明は、前記の核酸酵素の製造方法であって、該核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクターDNAを鋳型として、RNAに転写することを特徴とする、前記の方法を提供する。

#### 【0024】

本発明はさらに、前記の核酸酵素を含む遺伝子導入ベヒクルを提供する。ベヒクルの例は正電荷脂質、特に正電荷リポソーム（たとえば、リポフェクチン、DOT MA、DOSPA、正電荷コレステロールなど）である。この場合、ベヒクルは遺伝子導入ベクターの代用として使用されるが、本発明の核酸酵素であるトランス・マシキザイムRNAに化学修飾をほどこして生体内のRNA分解酵素に対して抵抗性をもたせてもよい。正電荷脂質を介して遺伝子を細胞内へ導入する方法に関する文献として、例えば蛋白核酸酵素第44巻(第11号)第1590~1596頁(1999年)が挙げられる。

## 【0025】

さらにまた、本発明は、前記の核酸酵素、または該核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクター、または正電荷リポソームを有効成分として含む医薬組成物も提供する。この医薬組成物は、標的RNAが原因となって生じる疾病を予防および／または治療するためのものであるとよい。例えば、標的遺伝子としては、アポトーシス阻止因子として上述した**ccl-2**などがよく、一方、共存することにより認識されるRNAとしては、HIV（エイズ）のtat蛋白質をコードするmRNAや各種癌の特異的表面抗原をコードするmRNAなどが挙げられる。本発明の医薬組成物は、この場合、HIV等のウイルスに感染した細胞や癌細胞などの有害細胞のみを選択的に殺すことが可能となる。

## 【0026】

本発明はさらに、上記定義の核酸酵素を含む宿主細胞であって、大腸菌などの原核細胞、ヒト細胞、哺乳類細胞、植物細胞、酵母細胞など真核細胞から選択される宿主細胞を提供する。

## 【0027】

本発明はさらに、前記の核酸酵素を用いて標的RNAをin vivo、in vitroまたはex vivoで特異的に切断する方法を提供する。ここで、in vivoまたはex vivoでの方法の場合、動物(特に哺乳類)および植物が対照となる。標的RNAとしては、疾病の原因となる異常型mRNAが例示される。

## 【0028】

本発明はさらに、上記定義の核酸酵素を含有する診断薬を提供する。本発明の

核酸酵素は正常細胞に対して不活性であるが、一方有害細胞のアポトーシスに導くことができるため、この診断薬は、たとえばエイズなどのウイルス感染または癌の診断に使用できる。

## 【0029】

## 【発明の実施の形態】

以下、本発明を図面を参照しながら詳細に説明する。

特定のRNA配列に結合することにより別の特定の標的RNAに対する切断活性を発現する核酸酵素（トランス・マキシザイム）の設計について説明する。

## 【0030】

これまでに、本発明者らが開発したマキシザイムは、そのダイマー構造ゆえに活性中心領域と基質結合領域を2つずつ持っている(Kuwabara, T., Warashina, M., Tanabe, T., Tani, K., Asano, S. and Taira, K. (1998a) A novel allosterically trans-activated ribozyme, the maxizyme, with exceptional specificity in vitro and in vivo. Mol. Cell 2, 617-627)(図1B)。そこで、一方の基質結合領域で異常なBCR-ABL chimeric mRNAのジャンクション部位に結合し、もう一方の基質結合領域で、ジャンクションから遠く離れた箇所にある、最も効率のよい切断配列に結合し、その(GUC)トリプレットの後で基質を切断するというシステムが構築された(Kuwabara, T.ら、上記)。いわば、片方の基質結合領域は異常型の基質を認識する“目”として働き、もう片方の基質結合領域が基質を切断するリボザイムの働きの“実”を担う腕として機能する。

## 【0031】

この構築では、マキシザイムの一方の基質結合領域が異常なBCR-ABLキメラmRNAのジャンクション部位に結合したときに初めて、リボザイムとして活性を発現できる安定なダイマー構造が形成された。すなわち、ダイマーの安定性を左右するのが、stem II部分の塩基対の形成にある。この塩基対の安定性が高過ぎると、ダイマー型ミニザイムは（基質がなくても）それ自体でダイマー構造を形成してしまう。マキシザイムの基質を切断する側の基質結合領域が、“目”として基質を認識するもう片方の基質結合領域が機能する、しないにかかわらず、対象となる基質領域に結合してしまう。そうすると、切断する部分の配列は正常型mRNA

であるABL mRNAやBCR mRNA上にもあるので、結局従来のハンマー・ヘッド型リボザイムで問題となっている非特異的な切断が生じることに変わりはなくなってしまう。そうかといってstem II部分の塩基対の安定性が低過ぎると、活性型のダイマー構造が形成しにくくなり、基質切断効率の非常に低い、従来のミニザイム（図1A、右）と同様の問題点が生じてくる。

## 【0032】

本発明では、この双方の問題を克服できるような、微妙なstem II部分の塩基対の安定性の獲得と異常mRNA存在下でのみ活性型リボザイムを形成するような塩基配列の工夫がなされた。

## 【0033】

またさらに本発明では、このシステムの構築の場合、異常型のmRNAを認識して特異的に結合する側は、基質を切断するわけではない。そこでRNA鎖切断に必要な、金属イオンを捕らえる足場を提供する活性中心領域の配列を削ることができる。よって、これまでのマキシザイムをさらに小型化することができる（図4の右）。活性型ダイマー構造は、ターゲットとするmRNA（例えばBCR-ABL キメラmRNA）と、マキシザイムの2カ所の基質結合領域が正しく結合したときのみ形成される。ターゲットとしない正常型mRNA（例えばABL mRNA）の存在下では、不活性型の構造しかないように設計されている。ジャンクションを認識する側の基質結合領域に正常型mRNA 配列がやってきた場合、不活性型構造をとる。ハンマー・ヘッド型リボザイムの切断活性にとって必須なマグネシウムイオンを捕らえる活性中心部位の構造が、活性型ダイマー構造と違って、崩れている。この結果、このダイマー型ミニザイムによる正常型mRNAへの、非特異的切断は起こらない。また、基質を切断する側の基質結合領域が、単独で基質と結合したとしても（※この場合、結合する基質としては正常型mRNAと標的mRNAの双方が考えられる。）、もう一方の基質結合領域に標的のBCR-ABL キメラmRNAの配列が来ない限り、活性部位が閉じた構造を形成する。この結果、切断に必須となるマグネシウムイオンを捕らえられないので、切断は起こらない（図5）。

## 【0034】

このように、キメラRNAを破壊することができるリボザイムを設計するため

に、ジャンクション配列を標的にし、該キメラRNAの一部を共有する正常なRNAのリボザイムによる切断を制御し、宿主細胞もしくは組織には害を与えないマキシザイムを見出した。適用しうる宿主としては動物、特にヒトを含む哺乳類、または植物である。

## 【0035】

以上、説明したマキシザイムにおいては、同一分子(mRNA)内に、目となる配列認識部位(センサー部位)とマキシザイムが切断する標的配列が存在するように設計された。本発明では、マキシザイムの目により認識される部位と切断活性部位が同一分子上にない場合を想定している。すなわち、マキシザイムがあるmRNAを認識した時に、異なるmRNAを切断するように設計される。本発明のマキシザイムを用いることによって、特定のmRNAの発現を条件とした、別のmRNAの発現阻害が可能となる。このことは、例えば、ウイルス感染細胞或いはウイルス自体が発現する特定のmRNAの存在下、宿主細胞の生存に不可欠なmRNAを切断することにより、ウイルス感染した細胞のみ、選択的に殺すことができる示唆する。

## 【0036】

## 【実施例】

本発明を以下の実施例によりさらに具体的に説明する。本発明の範囲は、これらの実施例に限定されることはない。

## (実施例1) トランスマキシザイムの設計

図3Bおよび図3Cに示した、トランスマキシザイムの各モノマーを、DNA/RNA合成機(モデル394; Applied Biosystems, Division of Perkin Elmer Co. (ABI), Foster City, CA)で化学合成したRNAを、脱保護、脱塩、PAGEによる精製を行うことにより製造した。T-MzL、B-MzLの3'側とT-MzRとB-MzRの5'側は、アボトーシス阻止機能を有するbcl-2 mRNAの標的サイトに対して相補的に結合し、切断活性部位を形成するように設計した。T-MzLの5'側とT-MzRの3'側は、HIV-1 tat mRNAを認識するように設計した(HIV-1系トランスマキシザイム、T-Mz:図3B)。B-MzLの5'側とB-MzRの3'側は、BCR-ABL mRNAを認識するように設計した(CML系トランスマキシザイム、B-Mz:図3C)。一方、HIV-1感

染がなく、細胞内にHIV-1 tat mRNAが存在しない場合には、図3Bの右側に示したように、活性中心部位を含んだ大幅な構造変化により、活性に必須となる金属イオンの取り込みが不可能となり、宿主のbcl-2 mRNAの切断は生じないように設計した。また、慢性骨髓性白血病のマーカー遺伝子であるBCR-ABL mRNAが細胞内に存在しない場合には、図3Cの下側に示したように、たとえ部分的に同じ配列を含むABL mRNAと結合しても活性中心部位を含んだ大幅な構造変化により、活性に必須となる金属イオンの取り込みが不可能となり、宿主のbcl-2 mRNAの切断は生じないように設計した。さらに評価のコントロールとして、bcl-2 mRNA上の同じ部位を切断する野生型のハンマーHEAD型リボザイム（図3A, Wt Rz）、HIV-1系、CML系の両MzRの活性中心部位（CUGAUGA）配列を（CUAAUGA）配列に変えることによって金属イオンの補足を不可能にした不活性型のトランス・マキシザイム（I-T-MzおよびI-B-Mz）も作成した。

## 【0037】

従来のマキシザイム（Mz）が同一mRNAに対してセンサー機能と切断機能を発揮するのに対して、本発明で設計したマキシザイムは、2分子のmRNA間で、センサー機能と切断機能を発揮することが期待されることより、トランス・マキシザイムと命名した。

## 【0038】

(実施例2) トランス・マキシザイムの試験管内での切断活性と基質特異性

トランス・マキシザイムの切断活性および基質特異性は、以下のようにして評価することができる。bcl-2 mRNAの一部の配列（300 mer）をT4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造、京都、日本）により[γ-<sup>32</sup>P]-ATPで標識した。各酵素を1 μMの濃度で、2 nMの5'末端を<sup>32</sup>Pで標識したbcl-2 mRNAと共にインキュベートした。これとトランス・マキシザイムをTris-HCl (pH 8.0)緩衝液中に混合させた。各酵素および基質を含む緩衝化溶液に10 mM MgCl<sub>2</sub>を加えることにより反応を開始させ、37°Cで60分間反応させる。最後に、反応混合物を5%ポリアクリルアミド/7 M 尿素ゲルを用いた電気泳動にかけた。切断の有無をBAS2000イメージアナライザーで検出した。

## 【0039】

図6AにHIV-1系、図6BにCML系の実験結果を示す。HIV-1系では、HIV-1 tat mRNA存在下において初めて**ccl-2** mRNAを特異的に切断していることが確認された(T-Mz)。CML系では、正常型ABL mRNA存在下では**ccl-2** mRNAは切らずに、BCR-ABL mRNA存在下において初めて**ccl-2** mRNAを特異的に切断していることを確認した(B-Mz)。トランス・マキシザイムの活性のアッセイは、10 mM MgCl<sub>2</sub>および50 mM Tris-HCl (pH 8.0)を用いて、酵素飽和(1代謝回転)条件下で37°Cで60分間のインキュベーションを行なって実施した。

## 【0040】

また、どちらの場合も野生型のリボザイムWt Rz(図3A)は疾病特異的mRNAの存在有無に拘らず、**ccl-2** mRNAを切断した。また金属イオンの取り込み能を不活化したI-T-Mz, I-B-Mz、およびトランス・マキシザイムのモノマー成分(T-MzL, T-MzR, B-MzL, B-MzR)単独では切断は生じないことも確認した。

## 【0041】

(実施例3) トランス・マキシザイムの遺伝子治療への応用

生体内でリボザイムを発現させる場合、外部から合成リボザイムをカチオン性の脂質膜などで包んで導入する方法(Malone, RW. Felgner, PL., Vermn, IM (1989) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86, 6077)と、ベクターDNA(ウイルスベクターなどを用いて)として導入して細胞内で発現させる方法(Friedmann, T., Roblin, R. (1972) Science 175, 949)の2種類がある。

## 【0042】

本発明のトランス・リボザイムをコードするDNAを含む発現ベクターは、pol I系プロモーター、pol III系プロモーター(tRNA、snRNA等)などのRNAポリメラーゼプロモーター、ターミネーター配列及びマキシザイムの配列を連結したもの(tRNA<sup>val</sup>-MzL, tRNA<sup>val</sup>-MzR)をpUC19(Takara)、pGREEN LANTERN(ライフテックオリエンタル株式会社製)、pHaMDR(HUMAN GENE THERAPY 6:905-915(July 1995))などのベクターに組み込むことにより、作製することができる。発現されるtRNA<sup>val</sup>T-MzLの2次構造を一例として図7Aに示す。

## 【0043】

上記のようにして作製した発現ベクターは、以下のようにして細胞内へ導入す

ることができる。

#### ①リポフェクション(Lipofection) 法

細胞の表面は負に荷電している。そこで、目的のベクター(DNA 2本鎖環状プラスミド)とカチオン性の脂質(リポフェクション試薬(リポフェクチンなど))とで複合体をつくり、それを細胞内へ導入する。

#### ②ウイルスベクター法

①に比べ効率が高い。ウイルスの遺伝情報のうち遺伝子発現に必要な部分のみを残し、そこへ治療効果をもつ配列(tRNA<sup>val</sup> MzL, tRNA<sup>val</sup> MzRのDNA配列)を組みこんだものを用意する。このベクターをウイルスの力によって目的細胞のDNAに組み込む。

#### 【0044】

ベクター配列中のマキシザイムには、RNA ポリメラーゼIII のプロモーター配列が付加されている(例、図7A)。細胞内に導入されたベクターDNAから、元来細胞内で機能しているRNA ポリメラーゼIII の働きにより、治療効果をもつRNA配列が転写されることにより、高い発現力でトランス・マキシザイムが発現される。

#### 【0045】

HIV-1系トランス・マキシザイムはNP2/CD4/CXCR4細胞(東大医化学研究所より入手)、CML系トランス・マキシザイムはBV173細胞内でのトランス・マキシザイムの発現をノーザンハイブリダイゼーションにより調べた結果を図7Bに示す。細胞抽出RNAをアガロースゲルで泳動し、核酸吸着メンブレンにトランスファーさせた後、5'末端標識したトランス・マキシザイムに相補的な配列を持つDNAプローブをハイブリダイズさせた。その後、発現および局在の有無をBAS2000イメージアナライザーで検出した。どのトランス・マキシザイムも高発現しており、用いたtRNAプロモーター依存性の発現により、細胞質に輸送、局在していることが分かった。また、bcl-2, Tat, ABL, BCR-ABL mRNAの発現も同様に調べたところ、どれも細胞質に主に局在していることが分かった(図7C)。図中、Cは細胞質、Nは核を示す。トランス・マキシザイム、標的mRNA、疾病特異的mRNAが同じ局在を示すことは、細胞内で効果を発揮する上で重要である。

## 【0046】

(実施例4) トランス・マキシザイムのウイルス感染抑制効果

HIV-1系のトランス・マキシザイムの効果を調べた。トランス・マキシザイムが効率良く**bcl-2 mRNA**を切断することができると、**bcl-2**タンパク質の発現が抑制され、細胞はアポトーシスを起こす。そこで、アポトーシスが生じたかどうかをTunel法によって調べた。アポトーシスが進行すると、DNA分解が起きるが、Tunel法ではTdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) を用いてそのDNA断片にFITC標識dUTPを結合させる。それを蛍光顕微鏡で観察すると、アポトーシスを起こしている細胞は蛍光を発する。本実験ではIn situ cell death detection kit, Fluorescein (ロシュ・ダイアグノスティックス社) を用いて行った。

## 【0047】

図8Aに示されているように、HIV-1系トランス・マキシザイム (T-Mz) を導入した細胞が蛍光を発し、かなり進行したアポトーシスが観察された。しかし、HIV-1 tat mRNAが発現していない細胞 ((-)Tatとして表示) では、T-Mzを導入してもアポトーシスは起こらず、センサー能の高さが証明された。Wt Rzでも若干のアポトーシスは観察されたが、その進行度はかなり遅いものであることが細胞像を併せ見ると良く分かる。またモノマー(T-MzL, T-MzR)、不活性型のトランス・マキシザイム(T-I-Mz)では全くアポトーシスは観察されなかった。

## 【0048】

次に、実際のHIV-1のウイルス感染をどの程度阻害するかを調べた。24 well plateに3万の細胞を撒き、翌日、トランス・マキシザイム(T-Mz)を導入して、さらにその翌日(トランسفエクションより24時間後)、HIV(p24の濃度で10ng/mL)を感染させた。その後2日毎 (D2、D4、D6；図8B右) にアッセイを行った。アッセイ法はHIV患者血清を一次抗体にした蛍光抗体法によって行った。HIV抗原陽性細胞の%を求め、2回の平均値を図8Bに示している。野生型リボザイム (Wt RZ、図3A) は4日後には、ある程度までウイルス感染が抑制されたが6日後にHIV-1のウイルス感染が一気に進むと、その抑制能が大幅に低下した (D6、中央の青色バー)。トランス・マキシザイムは安定して極めて高い効果を発揮し、6日後にはウイルス感染細胞を死滅させることによりHIV抗原陽性細胞はほぼ0%になった (D

6、右側の赤色バー)。

【0049】

(実施例5) トランス・マキシザイムの癌細胞死滅効果

つぎに、CML(慢性骨髓性白血病)系のトランス・マキシザイムの効果を調べた。Tunel法の原理および実験方法は上述と同じであるが、ここでは多種の細胞を用いた。まずCMLの特異的なmRNAであるBCR-ABL mRNAを発現していない細胞として、H9細胞とHL60細胞、CMLヒト細胞としてBV173細胞、Primary CML細胞、最後にネズミから樹立されたBaF3細胞にヒトのBCR-ABL mRNAを発現させたBaF3/p210<sup>B</sup>CR-ABL細胞である。また均等にDNAを染色する細胞を固定化した後にPropidium Iodide (PI) を添加し、低波長側（赤色）で全細胞を発光させた。赤色蛍光の全細胞中に緑色蛍光のアポトーシス細胞がどれだけいるかが、アポトーシスの度合いを示すことになる。

【0050】

図9に示されているように、T-MzはCMLヒト細胞であるBV173細胞、Primary CM L細胞のみに高い頻度でアポトーシスを生じさせた。BaF3/p210<sup>B</sup>CR-ABL細胞はBCR-ABL mRNAは発現しているが、ネズミ由来の配列をもつbcl-2 mRNAが発現しているため、アポトーシスは生じない。Wt Rzは、BaF3/p210<sup>B</sup>CR-ABL細胞と同じように標的mRNA配列がないためアポトーシスを生じさせなかつたが、それ以外の細胞ではBCR-ABL mRNAを発現している、いないに拘らずアポトーシスを生じさせた。

【0051】

(実施例6) トランス・マキシザイムの細胞内での標的mRNA切断効果

つぎに、トランス・マキシザイムの標的mRNA切断効果を調べた。アポトーシスシグナルの伝達およびアポトーシスの達成には、いくつかのアスパラギン酸特異的システインプロテアーゼ [カスパーーゼ(caspase)として知られている] の協調作用(coordinated actions)が必要である。図10AにHIV-1系のトランス・マキシザイムのbcl-2タンパク質発現阻害を見たWesternプロットの結果、図10Bにアポトーシスのカスケード中最後に活性化されるCaspaseであるCaspase-3の活性化を見たWesternプロットを示した。細胞抽出物を15% ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにかけた。プロカスパーーゼ-3およびプロセシングされた p17 (

カスパーゼ-3) の両方を認識するウサギポリクローナル抗体  $\alpha$  CPP32 (University of South Florida, College of MedicineのHong-Gang Wang教授から好意により提供された) を用いて、プロカスパーゼ-3の活性化を検出した。ブロッキングおよび検出はDubrezらの方法に従って実施した (Dubrezら, Blood, 7, 2415-2422, 1998)。一方、*bcl-2*については、*bcl-2*に対するウサギポリクローナル抗体 (コスモバイオ) を用いて*bcl-2*を検出した。

## 【0052】

図10Aをみて分かるように、Wt Rzでは、tat mRNAの有無によらず、*bcl-2*の発現阻害が若干観察された。これに対してトランス・マキシザイムの場合では、tat mRNAが存在しない場合は*bcl-2*の発現量に変化がなく、tat mRNAが存在する時のみ発現阻害が観察された。他のマキシザイムモノマー (MzL, MzR) や不活性化マキシザイムでは、*bcl-2*の発現の低下は観察されなかった。

## 【0053】

一方、*bcl-2*の発現阻害に伴い、アポトーシス誘導に関するプロカスパーゼ-3の低下とカスパーゼ-3の活性化を指標としてみてみると、Wt Rzではtat mRNAの有無によらずカスパーゼ-3が活性化しているのに対して、トランス・マキシザイムでは、tat mRNAが存在する場合でのみ、カスパーゼ-3の活性化が確認できた。

他のマキシザイムモノマーや (MzL, MzR) 不活性化マキシザイムでは、tat mRNAが存在する場合においてもカスパーゼ-3の活性化は確認できなかった (図10B)。

## 【0054】

また図10CにCML系のトランス・マキシザイム (B-Mz) のアポトーシス効果を、以前に構築したBCR-ABL mRNAを切断するマキシザイム (Mz) と比較したグラフを示す。BCR-ABL mRNAを認識してそれ自身を切断する前回までの構築より、BCR-ABL mRNAを認識して細胞により必要不可欠な (つまり、実際にアポトーシスをより強く阻害している) *bcl-2* mRNAを切断するトランス・マキシザイム構築の方が、より優れていることが分かった。また図10Dに示したCML系のトランス・マキシザイムによる*bcl-2*タンパク質発現阻害を見たWesternプロット、図10Eに示したCaspase-3の活性化を見たWesternプロットをからも、HIV-1系と同様に、C

ML系のトランス・マキシザイムの高い細胞内での活性と非常に高い特異性が証明された。

【0055】

【発明の効果】

本発明の核酸酵素であるトランス・マキシザイムを用いれば、正常細胞のmRNAに全く影響を与えることなく、ウイルス感染細胞や癌化した細胞の増殖を特異的に抑制したり、アポトーシスを誘導することが可能となり、有効で安全な各種疾患の治療に有効である。したがって、本発明は、医薬、特に、癌細胞やウイルス感染細胞などにアポトーシスを特異的に誘導させることにより治療効果を發揮する医薬として使用することができる。

【0056】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Secretary of Agency of Industrial Science and Technology

<120> Nucleic acid enzymes acquiring an activity for cleaving a certain target RNA by recognizing another RNA molecule

<130> 117F0118

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 32

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: maxizyme-constituting RNA molecule

<400> 1

gguccuggcc ugaugagagu gaugagcucu uc 32

<210> 2

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: maxizyme-constituting RNA molecule

<400> 2

gucugacugu ucaucgaaac cgggucc 27

<210> 3

<211> 33

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: maxizyme-constituting RNA molecule

&lt;400&gt; 3

gguccuggcc ugaugagagu uauugauggu cag

33

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: maxizyme-constituting RNA molecule

&lt;400&gt; 4

gaaggggcuuc uuucaucgaa accgggucc

29

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 88

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: tRNA<sup>Val</sup> promoter sequence

&lt;400&gt; 5

accguugguu uccguagugu agugguuuauc acguucgccu aacacgcgaa agguccccgg 60

uucgaaaccg ggcacuacaa aaaccaac

88

【0057】

【配列表フリー テキスト】

配列番号1 - 人工配列の説明：マキシザイムを構成するRNA分子

- 配列番号2 - 人工配列の説明：マキシザイムを構成するRNA分子  
 配列番号3 - 人工配列の説明：マキシザイムを構成するRNA分子  
 配列番号4 - 人工配列の説明：マキシザイムを構成するRNA分子  
 配列番号5 - 人工配列の説明：tRNA<sup>Val</sup>プロモーター配列

【図面の簡単な説明】

【図1】

この図は、ハンマーヘッド型リボザイムおよびマキシザイムの二次構造を示す。

【図2】

この図は、CMLの転座の種類とBCR-ABLキメラmRNAをターゲットとしたリボザイムの問題点を示す。

【図3】

この図は、bcl-2を狙った野生型のリボザイム、HIV-1系のトランス・マキシザイム、CML系のトランス・マキシザイムのデザインを示す。トランス・マキシザイムについては活性化構造および不活性化構造も併せて示す。

【図4】

この図は、同一分子内をセンサー認識して切断するマキシザイムの模擬図と、その小型化について示す。

【図5】

この図は、同一分子内をセンサー認識して切断するマキシザイムのアロステリック制御について示す

【図6】

この図は、トランス・マキシザイムの試験管内での切断実験結果を示す。

【図7】

この図は、細胞内で発現されるtRNA<sup>val</sup>付加型トランス・マキシザイムの二次構造および細胞内での発現、局在を調べたノーザンプロットの結果を示す。

【図8】

この図は、HIV-1系トランス・マキシザイムによるアポトーシスを見たTunel実験結果およびHIV-1のウイルス感染阻害効果を示す。

【図9】

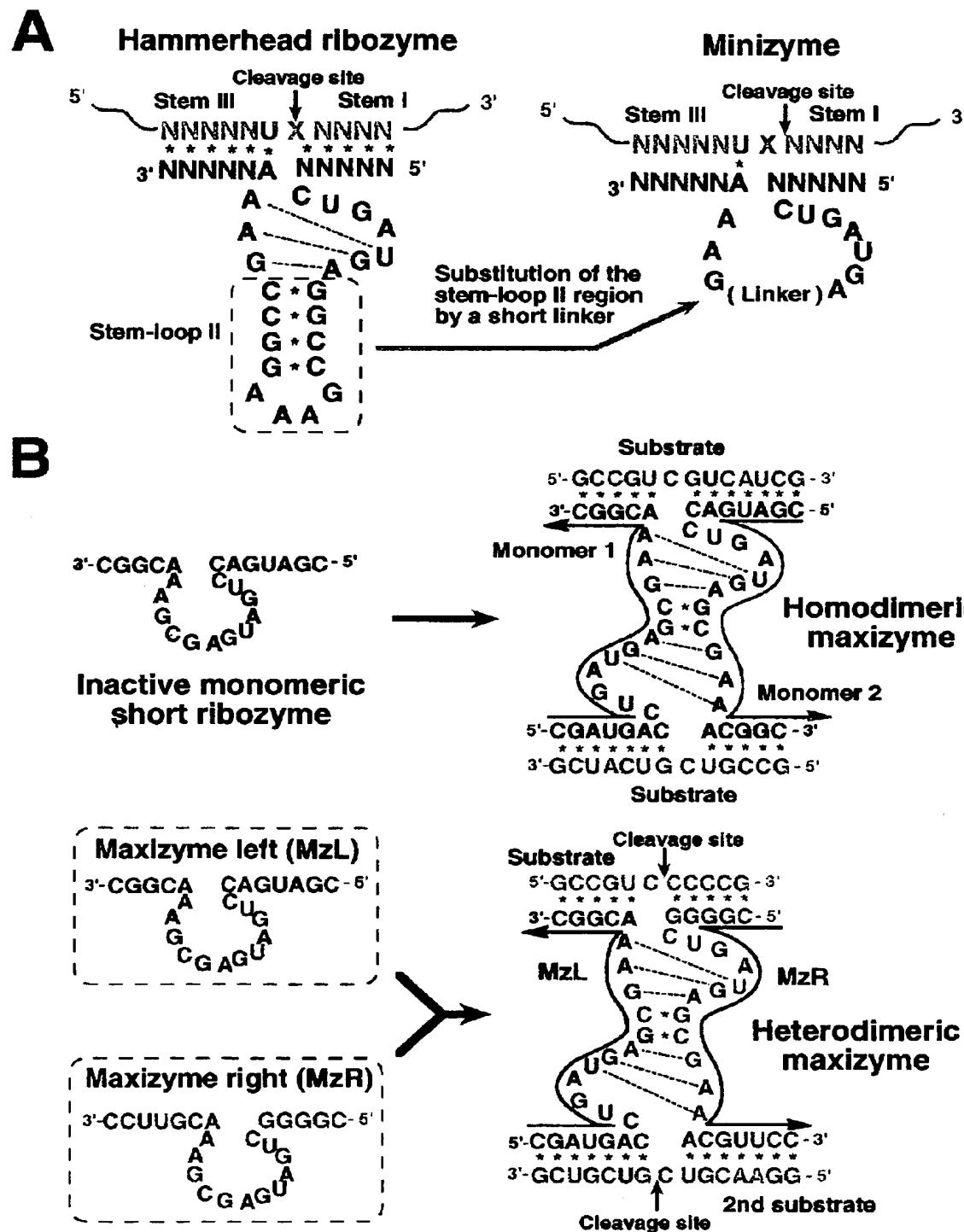
この図は、CML系トランス・マキシザイムによる種々の細胞でのアポトーシスを見たTunel実験結果を示す。

【図10】

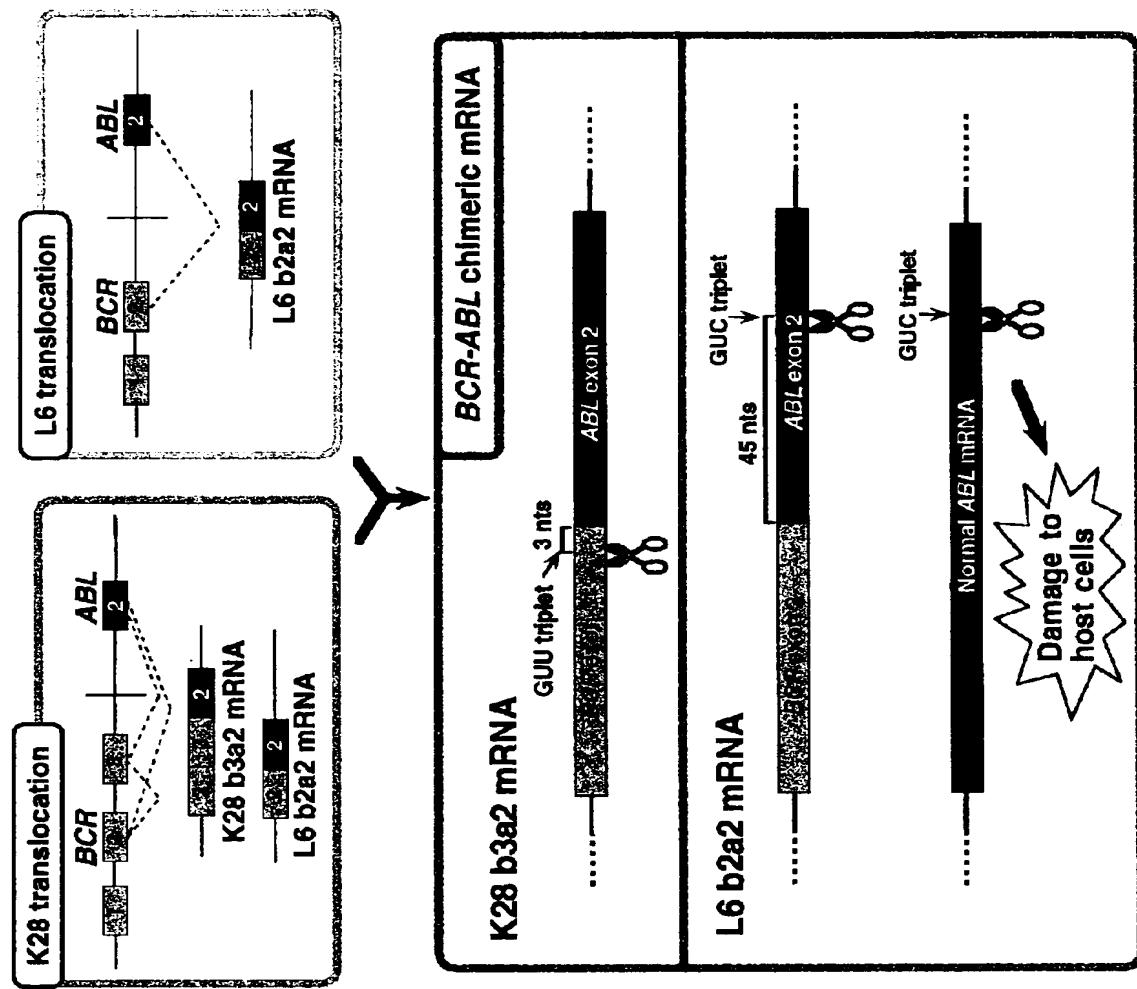
この図は、トランス・マキシザイムを培養細胞で発現させた際のウエスタン・プロッティング解析によるbcl-2およびカスパーゼ-3の活性化の結果を示す。

【書類名】 図面

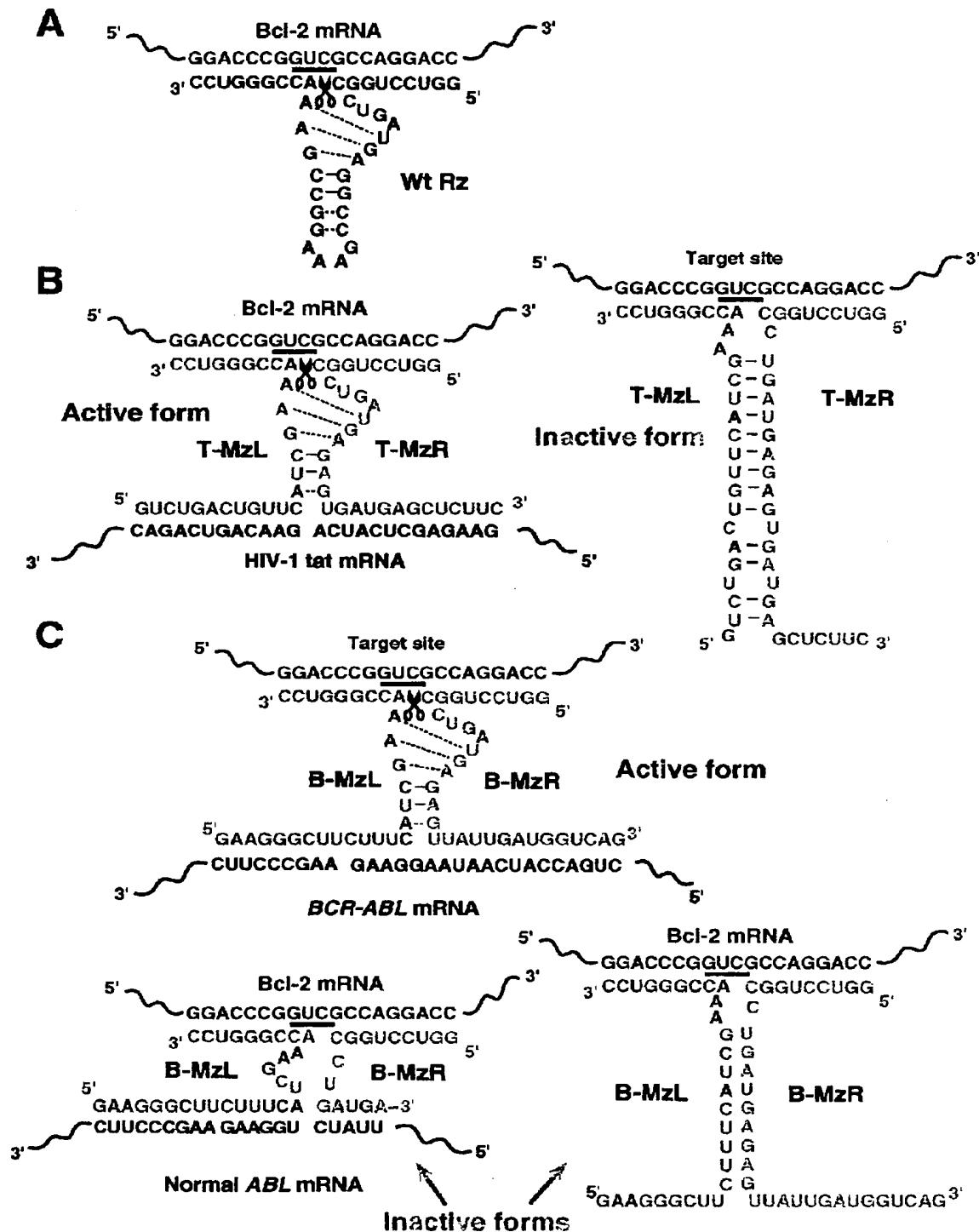
【図1】



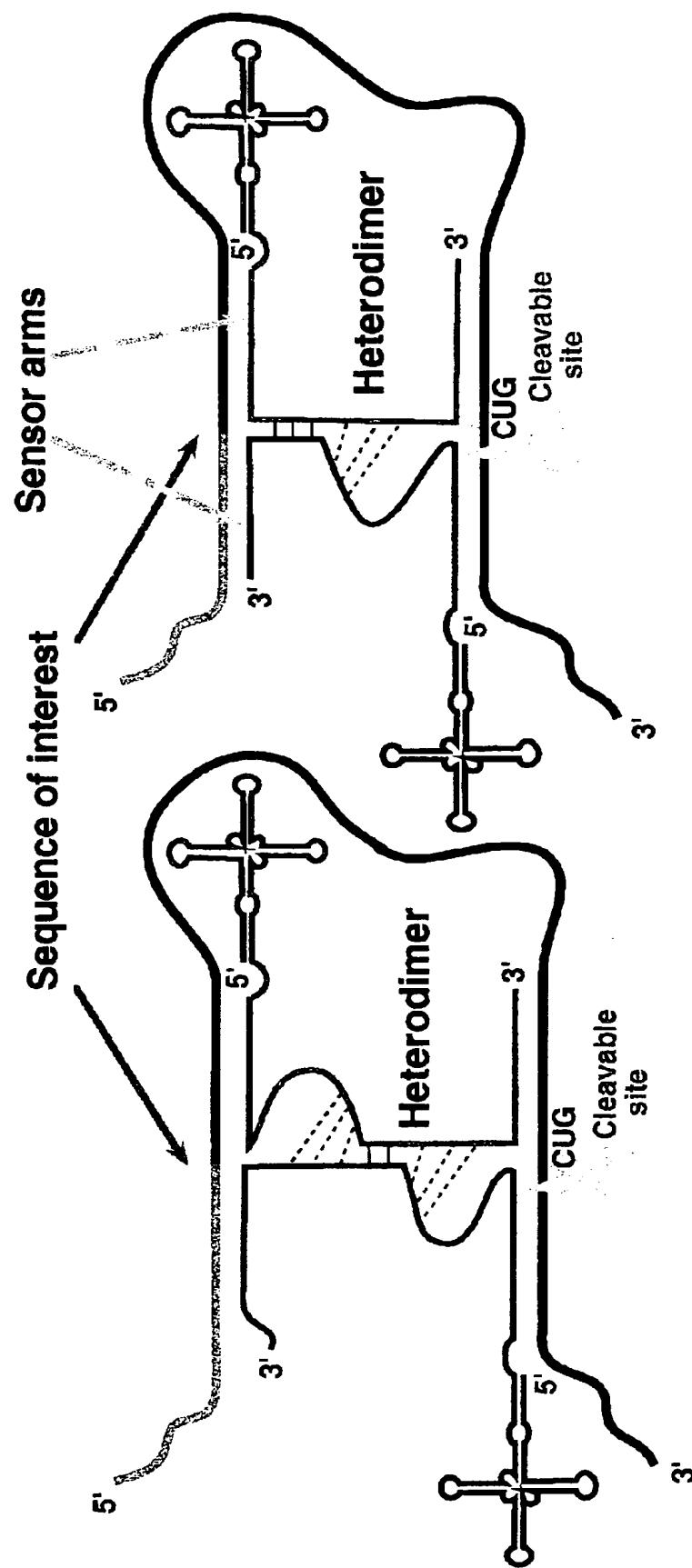
【図2】



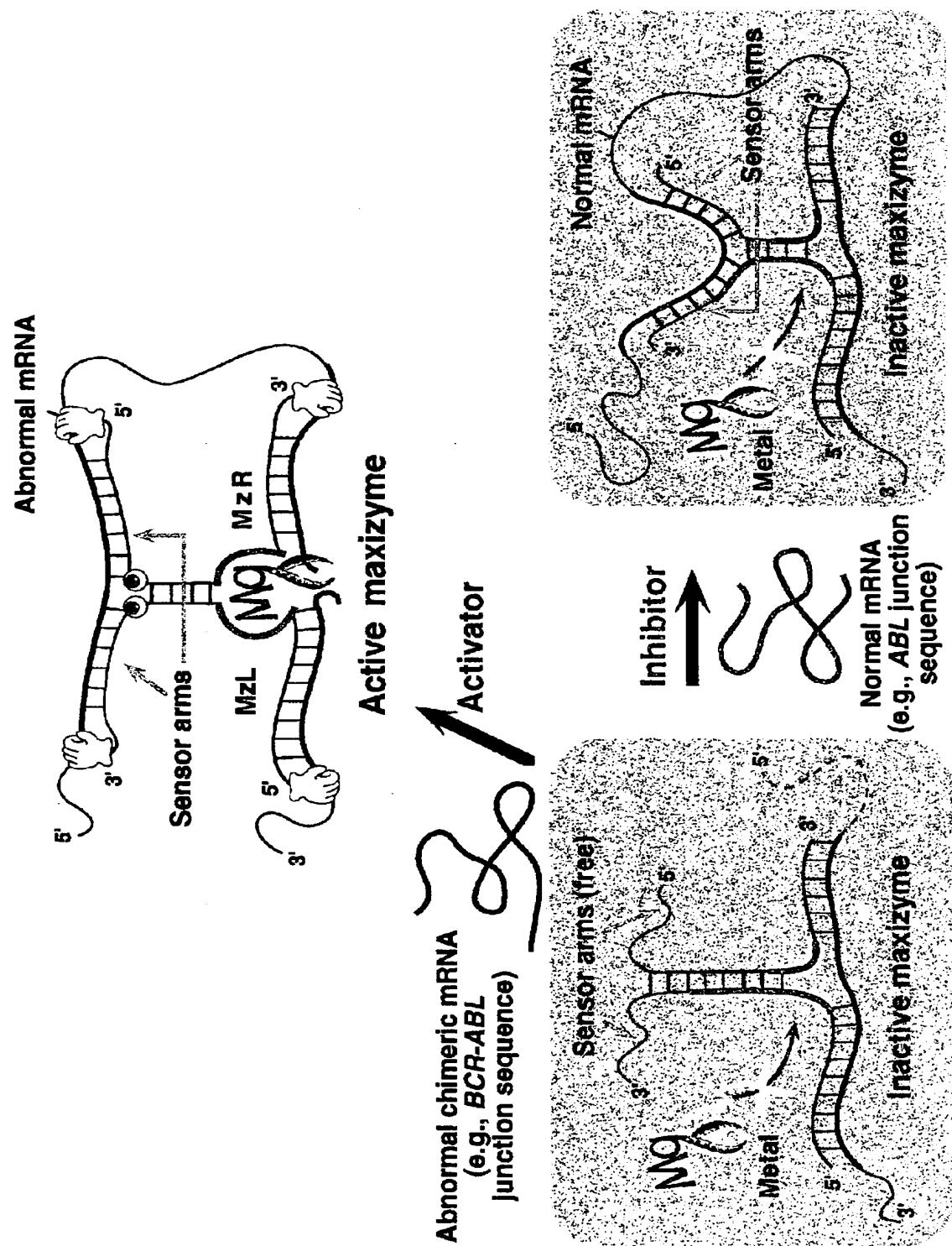
【図3】



【図4】



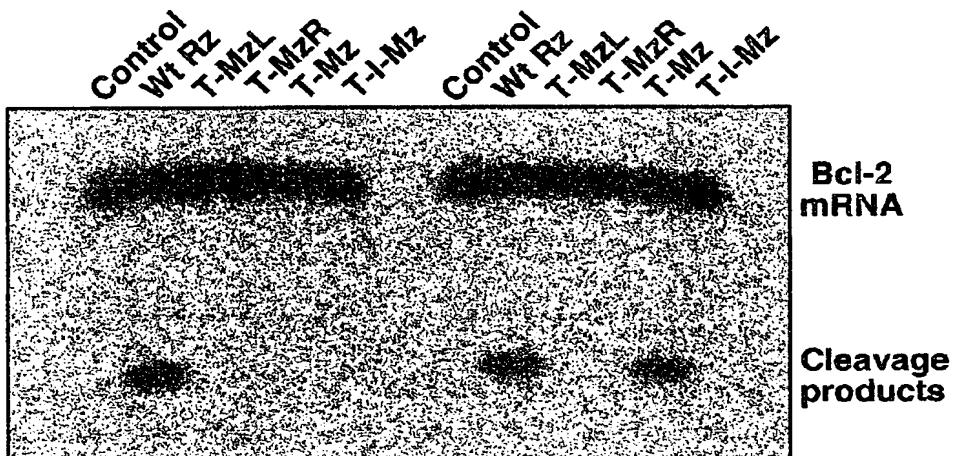
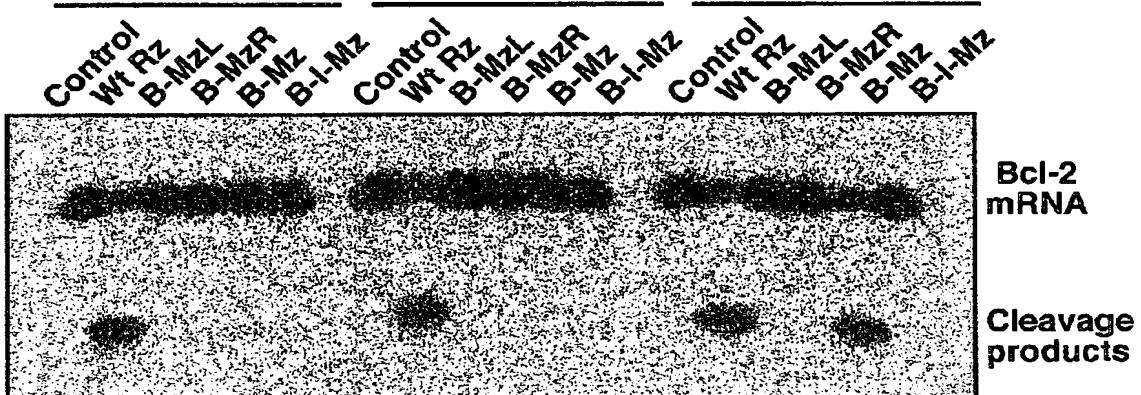
【図5】



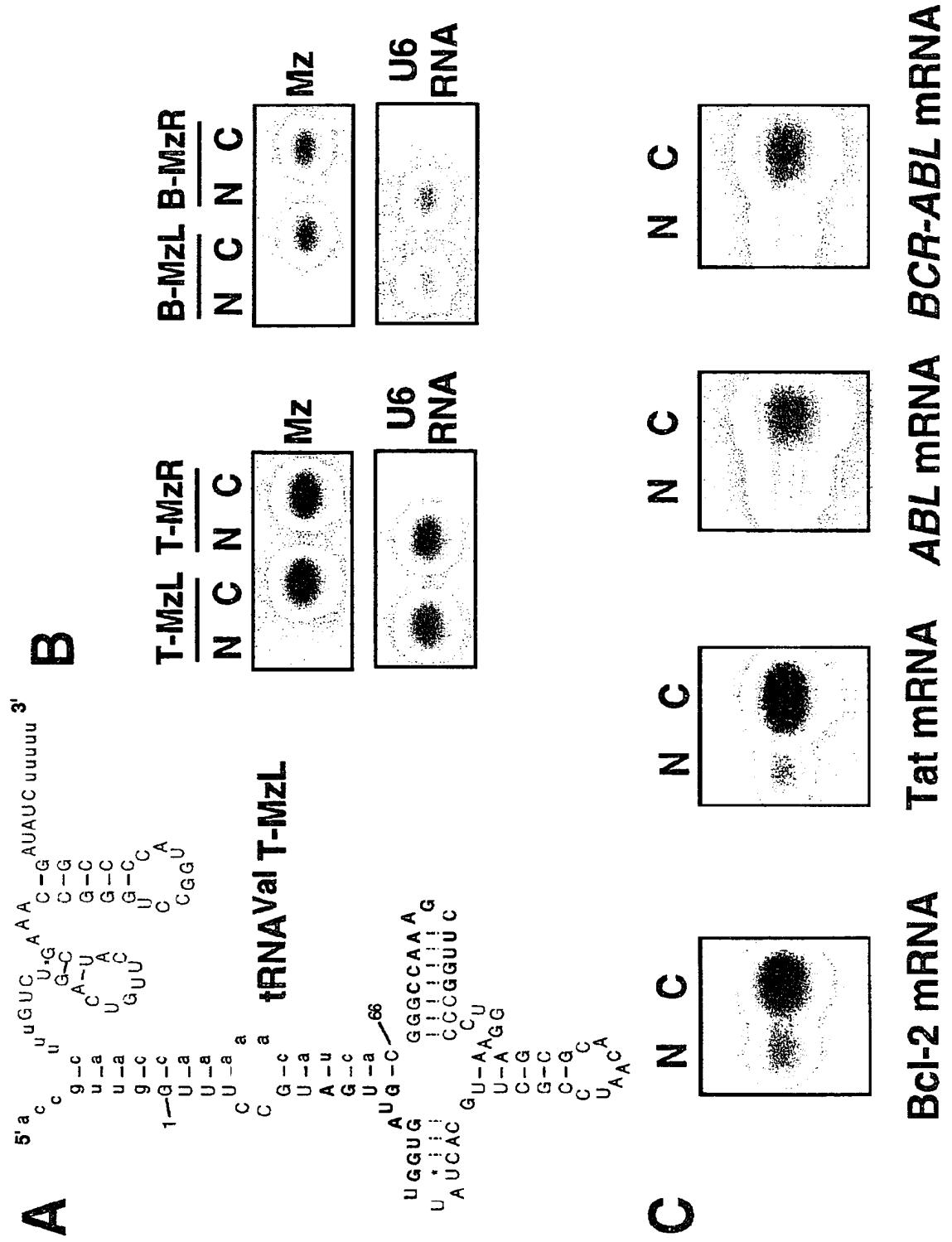
【図6】

**A**

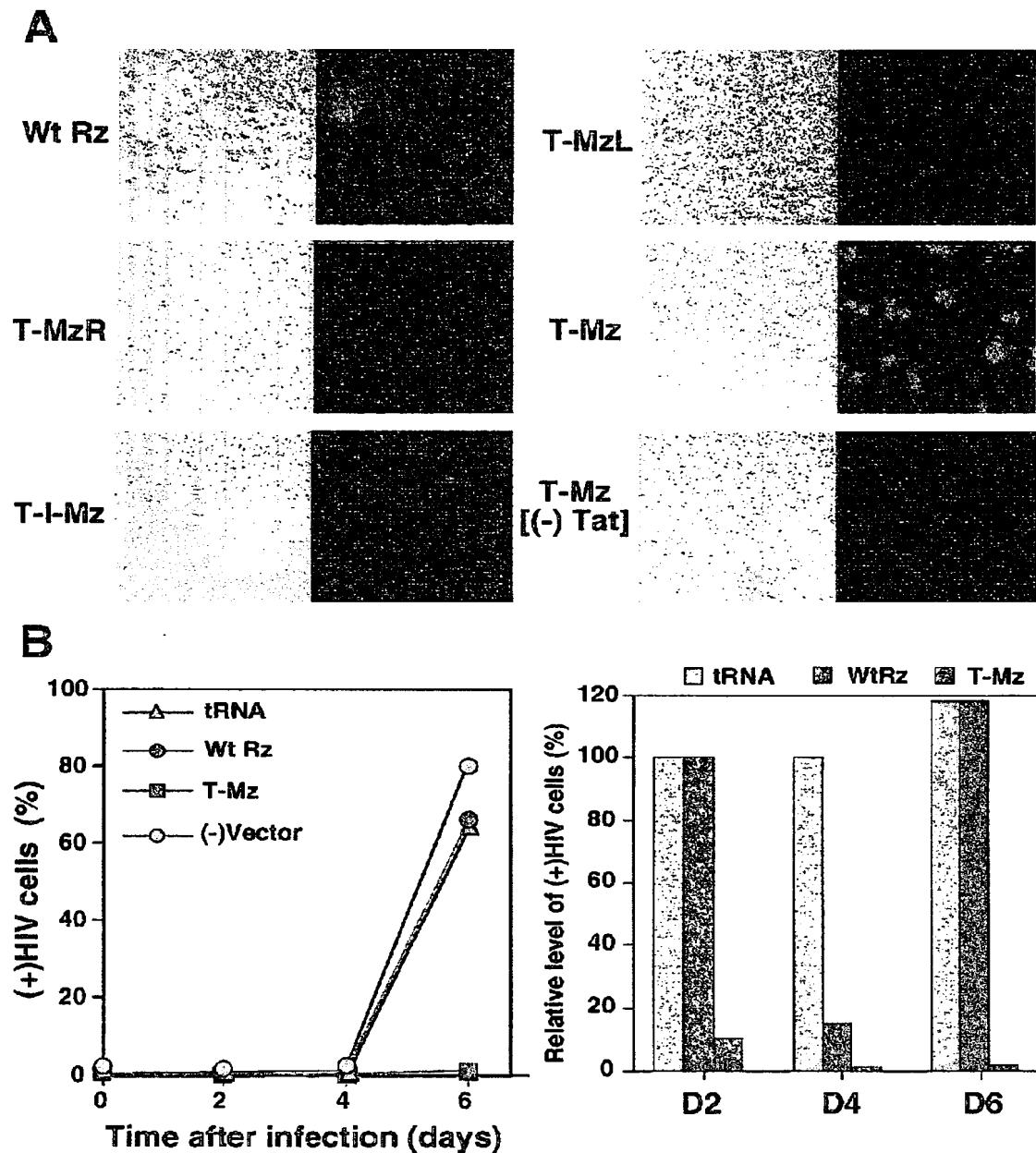
(-) HIV-1 tat mRNA (+) HIV-1 tat mRNA

**B**No effector (+) *ABL* mRNA (+) *BCR-ABL* mRNA

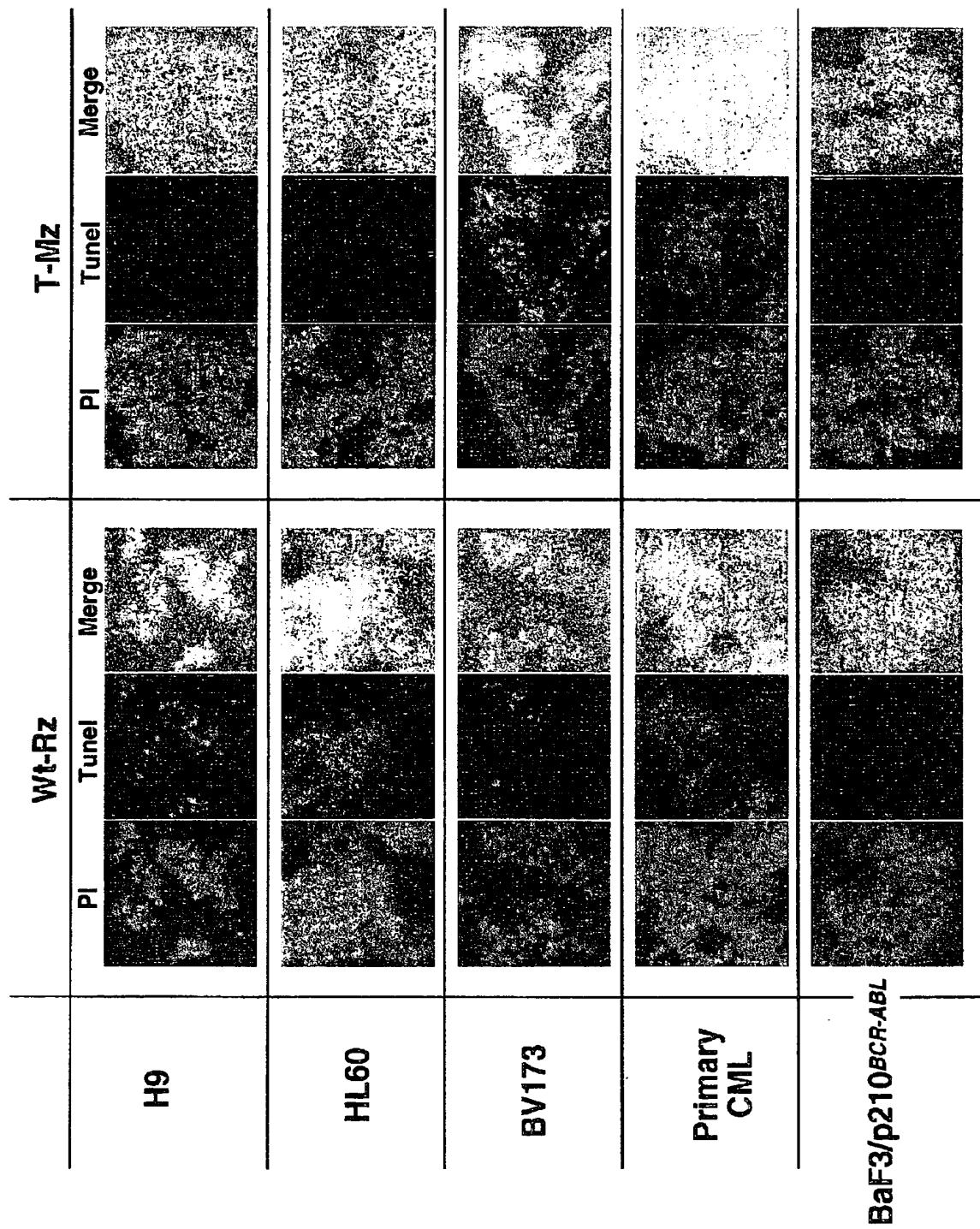
【図7】



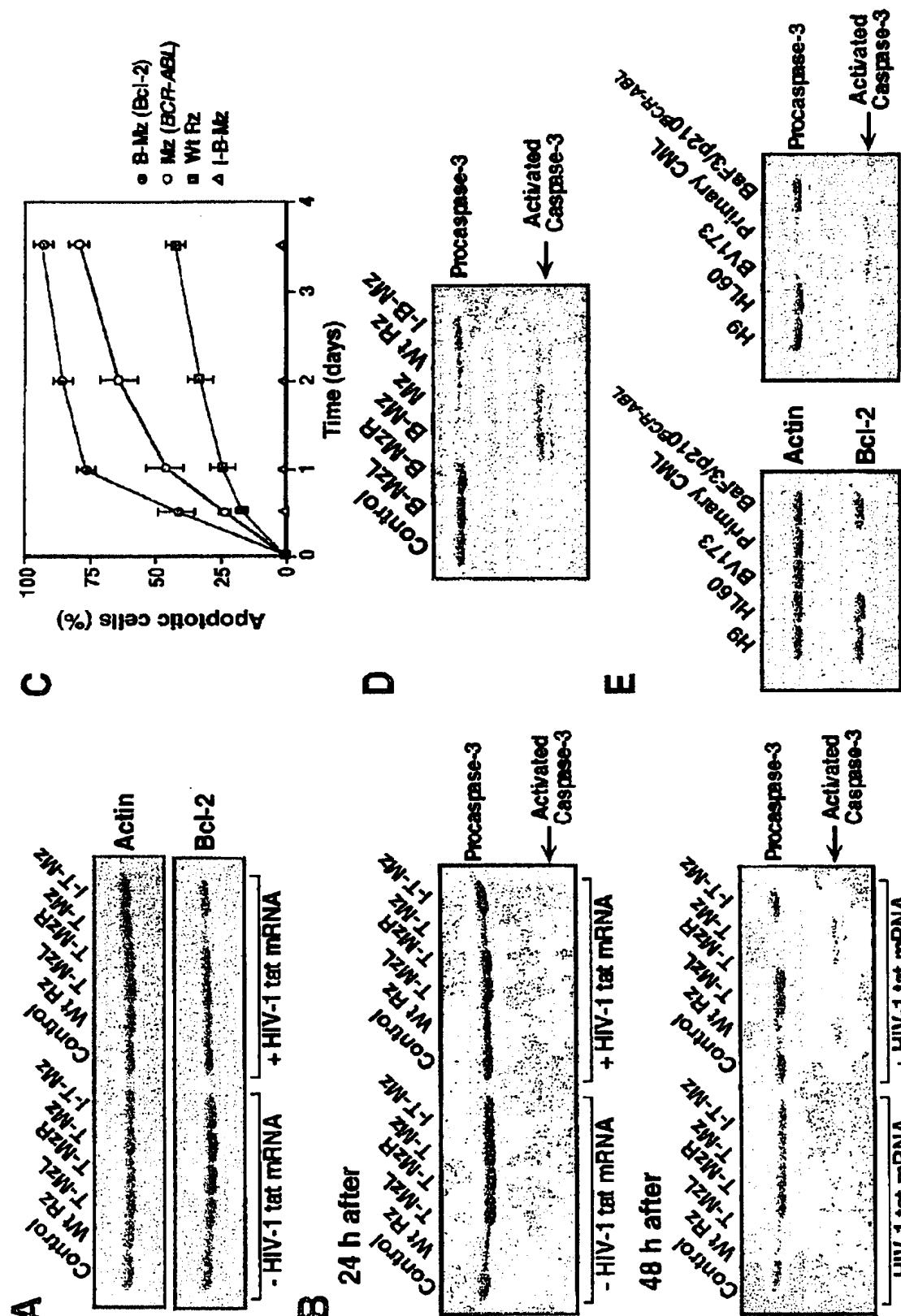
【図8】



【図9】



【図10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 感染細胞、癌化細胞などの有害細胞を選択的かつ効率的に死滅させるRNA切断活性をもつ核酸酵素、あるいは細胞特異的、時限特異的または人為的に導入したRNAによってRNA切断活性が調節可能な核酸酵素を提供する。

【解決手段】 センサー部位と切断活性部位を有する核酸酵素であって、切断活性部位が標的RNAと結合し、センサー部位が標的RNAと異なる別のRNAと結合した時のみ標的RNAに対し切断活性を示す、前記核酸酵素、ならびにその利用。

【選択図】 図8

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-313320
受付番号	50001326264
書類名	特許願
担当官	東海 明美 7069
作成日	平成12年10月19日

＜認定情報・付加情報＞

【特許出願人】

【識別番号】	000001144
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
【氏名又は名称】	工業技術院長

【指定代理人】

【識別番号】	220000415
【住所又は居所】	茨城県つくば市東1-1-4
【氏名又は名称】	工業技術院産業技術融合領域研究所長

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2000-313320

【承継人】

【識別番号】 301000011

【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関1-3-1

【氏名又は名称】 経済産業省産業技術総合研究所長 日下 一正

【連絡先】 部署名 経済産業省産業技術総合研究所

筑波研究支援総合事務所特許管理課

担当者 楠本 真 電話番号 0298-6

1-2179

【提出物件の目録】

【物件名】 権利の承継を証明する書面 1

【援用の表示】 平成3年特許願第42276号

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-313320
受付番号	50100082151
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	東海 明美 7069
作成日	平成13年 2月 9日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成13年 1月22日
【承継人】	申請人
【識別番号】	301000011
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
【氏名又は名称】	経済産業省産業技術総合研究所長

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2000-313320

【承継人】

【識別番号】 301021533

【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代表者】 吉川 弘之

【連絡先】 部署名 独立行政法人産業技術総合研究所

知的財産部知的財産管理室

担当者 長山 隆久

電話番号 0298-61-3282

【提出物件の目録】

【物件名】 権利の承継を証明する書面 1

【援用の表示】 平成6年特許願第39472号

【ブルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-313320
受付番号	50101456460
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	東海 明美 7069
作成日	平成13年10月 5日

＜認定情報・付加情報＞

【提出日】 平成13年10月 2日

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [000001144]

1. 変更年月日 1990年 9月20日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

氏 名 工業技術院長

出願人履歴情報

識別番号 [301000011]

1. 変更年月日 2001年 1月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号  
氏 名 経済産業省産業技術総合研究所長

出願人履歴情報

識別番号 [301021533]

1. 変更年月日 2001年 4月 2日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関1-3-1  
氏 名 独立行政法人産業技術総合研究所